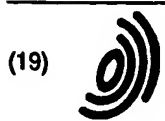


US03/03967

BEST AVAILABLE COPY



Europäisches Patentamt

(19)

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 861 896 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
02.09.1998 Patentblatt 1998/36

(21) Anmeldenummer: 98101338.6

(22) Anmeldetag: 27.01.1998

(51) Int. Cl.⁶: C12N 15/54, C12N 9/12,
C07K 14/705, C12Q 1/68,
C12Q 1/48, G01N 33/573,
C07K 16/40, A61K 31/70,
A61K 38/45

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 28.02.1997 DE 19708173

(71) Anmelder:
de Behring Marburg GmbH
35001 Marburg (DE)

(72) Erfinder:
• Lang, Florian, Prof. Dr.
72076 Tübingen (DE)
• Waldegger, Siegfried, Dr.
72071 Tübingen (DE)

(54) Zellvolumenregulierte humane Kinase h-sgk

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft die Klonierung und Charakterisierung einer humanen Serin/Threonin-Kinase (h-sgk serum and glucocorticoid dependent kinase). Weiterhin betrifft die Erfindung Reagenzien für die Diagnostik von Zuständen, die mit einer Änderung des Zellvolumens und/oder des "macromolecular crowdings" im Körper einhergehen, wie beispielsweise Hypermatriämie, Hyponatriämie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Hyperkatabolismus, hepatische Encephalopathie, Entzündungen und mikrobielle oder virale Infektionen. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Arzneimittel, enthaltend die h-sgk, Nukleinsäuren, welche für die h-sgk kodieren oder Rezeptoren, insbesondere Antikörper, die spezifisch an die h-sgk binden.

EP 0 861 896 A2

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Klonierung und Charakterisierung einer humanen Serin/Threonin-Kinase (h-sgk: serum and glucocorticoid dependent kinase). Weiterhin betrifft die Erfindung Reagenzien für die Diagnostik von Zuständen, die mit einer Änderung des Zellvolumens und/oder des "macromolecular crowding" im Körper einhergehen, wie beispielsweise Hyponatriämie, Hypernatriämie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Hyperkatabolismus, hepatische Enzephalopathie, Entzündungen und mikrobielle oder virale Infektionen. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Arzneimittel, enthaltend die h-sgk, Nukleinsäuren, welche für die h-sgk kodieren oder Rezeptoren, insbesondere Antikörper, die spezifisch an die h-sgk binden.

Selbst bei konstanter extrazellulärer Osmolarität ist die Konstanz des Zellvolumens ständig durch Transport über Zellmembranen und zellulären Metabolismus, d.h. Bildung und Abbau osmotisch aktiver Substanzen gefährdet.

Zellschwellung und -schrumpfung stören das intrazelluläre Milieu durch Verdünnung bzw. Konzentrierung von zellulären Makromolekülen, die zu massiver Beeinträchtigung der zellulären Funktionen führen. Daher haben Zellen eine Vielzahl von Zellvolumen-regulierenden Mechanismen entwickelt. Zellschwellung führt in den meisten Geweben zu einer zellulären Abgabe von Ionen durch Aktivierung von Ionenkanälen und KCl-Cotransport. Zellschrumpfung führt umgekehrt zu zellulärer Aufnahme von Ionen durch Aktivierung des NaCl/KCl-Cotransporters und Na⁺/H⁺-Austauschers.

Darüberhinaus stimuliert Zellschrumpfung die zelluläre Akkumulation und Zellschwellung die zelluläre Abgabe von Osmolyten, Molekülen, die speziell zur Erzeugung intrazellulärer Osmolarität eingesetzt werden [Burg, M. B. Am. J. Physiol. 268:F983-F996, 1995].

Schließlich beeinflussen Änderungen des Leberzellvolumens hepatozellulären Stoffwechsel und Genexpression [Häussinger et al. (1994) Am. J. Physiol. 267, E343-E355]. Zellschwellung wirkt wie ein anaboles Signal, das Protein- und Glykogensynthese stimuliert sowie Protein- und Glykogenabbau hemmt. Umgekehrt wirkt Zellschrumpfung als kataboles Signal, indem es den Abbau von Glykogen und Proteinen fördert und den Aufbau von Proteinen und Glykogen hemmt [Häussinger et al. (1994) Am. J. Physiol. 267, E343-E355].

Das Zellvolumen wurde als entscheidendes Element in der Regulation des Leberzellstoffwechsels durch Hormone, zelluläre Aminosäure-Aufnahme und oxidativen Stress erkannt.

Die Signalmechanismen, die die Zellfunktion an die Änderungen des zellulären Hydratationszustandes koppeln, sind weitgehend unbekannt. Änderungen des Zellvolumens erzielen ihre vielfältigen Wirkungen auf die Zellfunktion z.T. durch Stimulation oder Unterdrückung der Expression bestimmter Gene, deren Produkte dann

die Expression oder Aktivität einer Vielzahl von Zellkomponenten beeinflussen. Um Gene aufzudecken, die bei Zellschwellung vermehrt exprimiert werden, führten wir einen differentiellen mRNA fingerprinting Assay an cDNAs aus Hepatocyten durch, die entweder isotoner oder anisotoner extrazellulärer Flüssigkeit ausgesetzt worden waren. Dabei wurden mehrere Banden erhalten, die bei Verwendung unterschiedlicher Primer differentielle Expressionsraten aufwiesen.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die Expression einer dieser Banden unter hypertonen Bedingungen stimuliert und unter hypotonen Bedingungen gehemmt wurde. Die cDNA-Sequenz dieser in besonderer Weise durch Zellvolumenänderungen in ihrer Expression beeinflussten Bande, wurde genauer analysiert. Durch Sequenzvergleich wurde gefunden, daß keine Ähnlichkeit zu irgendeinem bereits bekannten menschlichen Gen gegeben ist. Das gefundene Gen, dessen Nukleotidsequenz in Fig. 1 dargestellt wird, kodiert überraschenderweise für eine Kinase, eine putative Serin-Threoninkinase. Ihre Sequenz ist in Fig. 2 sowie in Fig. 1 dargestellt. Sie ist hoch-homolog zur bereits bekannten Ratten-sgk (serum and glucocorticoid dependent kinase), einer Kinase, deren Expression durch Serum und Glucocorticoide gesteigert wird. Eine Zellvolumenabhängigkeit der Ratten-sgk ist bisher jedoch nicht beschrieben.

Die vorliegende Erfindung betrifft folglich eine humane zellvolumenregulierte Kinase (h-sgk), sowie Verfahren zu ihrer gentechnischen Herstellung.

Die Expression der h-sgk ist in hohem Maße vom Zellvolumen abhängig. Zellschwellung hemmt die Expression der h-sgk, während Zellschrumpfung die Expression der h-sgk stimuliert. Darüberhinaus wird die Expression der h-sgk durch Harnstoff gehemmt. Harnstoff beeinträchtigt wie Zellvolumenänderungen die Stabilität und damit die Funktion zellulärer Proteine, bzw. die Packungsdichte der zellulären Makromoleküle, das sog. macromolecular crowding [Minton, A.P., Mol. Cell. Biochem. 55: 119-140, 1983]. Die h-sgk-Expression ist daher ein Maß für das zelluläre "macromolecular crowding". Die Transkription der h-sgk wird jedoch, im Gegensatz zur Ratten-sgk, weder durch Corticoide noch durch fötales Kälberserum (FCS) beeinflusst.

Die h-sgk wird in einer Vielzahl menschlicher Gewebe exprimiert, wie Leber, Herz, Pankreas, Muskel, Niere, Lunge, Plazenta, Lymphocyten und mehreren Strukturen des Gehirns (Hippokampus, nucleus caudatus, corpus callosum, substantia nigra, nucleus subthalamicus und thalamus).

Es hat sich gezeigt, daß die h-sgk bei vielen Krankheiten, bei denen Zellvolumenänderungen eine entscheidende pathophysiologische Rolle spielen, ein beträchtliches diagnostisches Potential besitzt. Die Expression der h-sgk kann durch Nachweis und/ oder Quantifizierung der mRNA mit Hilfe geeigneter Probes, beispielsweise im Northern blot oder mittels In-Situ-Hybridisierung, und die h-sgk selbst kann beispiels-

weise mit Hilfe geeigneter Antikörper im Western blot oder durch Immunhistochemie nachgewiesen werden. Geeignete Proben bzw. Antikörper wurden bereits mit Erfolg auf Tauglichkeit überprüft.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die diagnostische Verwendung der h-sgk, ihrer Fragmente oder der jeweiligen dafür kodierenden Nukleinsäuren. Die möglichen zum Einsatz kommenden diagnostischen Techniken sind dem Fachmann bekannt. Es können dies alle aus dem Stand der Technik bekannten Immunoassayformate sein, wie beispielsweise Western blot oder Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), aber auch homogene nicht festphasengebundene Assayformate. Denkbar sind beispielsweise kompetitive Testvarianten, aber auch indirekte Tests oder Aufbauarten nach dem Sandwich-Prinzip sind ohne weiteres möglich. Ebenso können die dem Fachmann bekannten Markierungstechniken eingesetzt werden. Es können auch alle Arten der Nukleinsäurenachweistechniken angewandt werden, wie beispielsweise Southern blot, Northern blot und alle Varianten der Hybridisierungstechniken einschließlich In-Situ-Hybridisierung.

Die h-sgk kann sowohl in Körperflüssigkeiten, beispielsweise Blut, Plasma oder Serum, als auch in festen Geweben, beispielsweise Biopsiematerial nachgewiesen werden. Der Nachweis der h-sgk ist überall dort angezeigt, wo Änderungen des Zellvolumens bzw. des „macromolecular crowdings“ im Körper auftreten, wie bei Hyponatriämie, Hyponatriämie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Hyperkatabolismus, hepatischer Enzephalopathie, Entzündungen und Infektionen.

Darüberhinaus könnte eine gestörte Funktion der h-sgk zu einer gestörten Regulation des hepatischen Stoffwechsels führen. Ein Nachweis der h-sgk würde daher einer diagnostischen Abklärung von Fruktoseintoleranz, hyper- und hypoglykämischen Zuständen dienen.

Hypermatriämie: Dies ist eine lebensbedrohliche Störung, die beispielsweise bei osmotischer Diurese und Wasserdurese durch zentralen oder nephrogenen Diabetes insipidus auftritt. Ein zentraler Diabetes insipidus ist Folge eines genetischen Defektes, Schädel-Hirn-Trauma, Schädigung der hypothalamischen Neurone durch Entzündungen, Mangeldurchblutung, Tumore, Konsum von Alkohol, Opiaten und einigen Pharmaka. Ein nephrogener Diabetes insipidus ist Folge von genetischen Defekten, Hypokaliämie, Hypercalcämie, Proteinmangel, Pyelonephritis, und Behandlung mit verschiedenen Pharmaka, etc.. Wie in Experimenten an kultivierten Leber- und Nierenzellen gezeigt wird, führt eine Zunahme der extrazellulären Na^+ Konzentration, die immer auch mit einer Zunahme der extrazellulären Osmolarität verbunden ist, zu einer gesteigerten Expression der h-sgk. Die Kinase kann damit als Indikator für das Ausmaß an Zellschrumpfung herangezogen und zur Überprüfung der Therapie eingesetzt werden. Eine solche Kontrolle ist insofern

bedeutsam, als bei zu schneller Korrektur einer Hyponatriämie trotz extrazellulärer Hyperosmolarität mitunter eine letale Zellschwellung auftreten kann.

Hyponatriämie: Bei etwa 1 - 2 % aller hospitalisierten Patienten stellt man eine Hyponatriämie unter 130 mmol/l fest. Ursachen dieser lebensbedrohlichen Störung sind Diabetes mellitus, Ketonurie, Leberinsuffizienz, Diuretika, Opiate, verschiedene Pharmaka, osmotische Diurese, Bikarbonaturie, Nebenniereninsuffizienz, Salzverlust-Niere (-Nephritis), Nephrotisches Syndrom, gesteigerte Ausschüttung von ADH und Verluste von isotoner Flüssigkeit (z.B. Durchfälle) mit ausschließlichem Ersatz von Wasser. Ist die Hyponatriämie Folge einer Zunahme anderer Osmolyte im Blut, dann bleiben Zellvolumen und Expression der h-sgk normal. Reflektiert die Hyponatriämie jedoch eine Hypoosmolarität mit Zellschwellung, dann ist die Expression der h-sgk herabgesetzt. Die Messung der h-sgk erlaubt somit Rückschlüsse auf das Vorliegen einer Zellschwellung und ermöglicht eine rationale Entscheidung über das therapeutische Vorgehen. Während der Therapie kann die Kinase zur Verlaufskontrolle eingesetzt werden. Die zu schnelle Korrektur einer Hyponatriämie kann zu mitunter letaler Zellschrumpfung führen.

Diabetes mellitus: Bei Diabetes mellitus kommt es zur Hyperglykämie, die zum Anstieg der extrazellulären Osmolarität führt und damit eine Zellschrumpfung hervorruft. Die glomerulär filtrierte Glucose übersteigt die maximale renale Transportrate und erzwingt auf diese Weise eine osmotische Diurese, bei der Na^+ und Wasser verloren gehen. Dadurch kann sich eine Hyponatriämie entwickeln. Die gesteigerte extrazelluläre Osmolarität und das Überangebot an Glucose fördern die zelluläre Bildung von Sorbitol, das bei Absinken der extrazellulären Osmolarität zur Zellschwellung führt. Der Zellschrumpfung und der Zellschwellung bei Diabetes mellitus werden entscheidende Bedeutung bei der Pathophysiologie zugemessen [McManus et al., New England J. Med. 333: 1260-1266, Dermadash et al., Kidney intern 50:2032:2040, 1996]. Die Messung der h-sgk bei einem Patienten mit Diabetes mellitus erlaubt die Abschätzung der Zellvolumenänderungen und schafft damit eine solide Grundlage für den Ausgleich von Elektrolystörungen. Auch dabei kann eine Verlaufsbeobachtung überschüssige Korrekturen verhindern.

Niereninsuffizienz: Bei der Niereninsuffizienz kommt es zu einer massiven Zunahme der Harnstoffkonzentration auf Werte, welche eine destabilisierende Wirkung auf Proteine ausüben, Zellen schrumpfen lassen und eine Abnahme der h-sgk-Expression bewirken. Die destabilisierende Wirkung von Harnstoff wird durch die Bildung von Trimethylaminen abgeschwächt. Bei schnellen Änderungen der Harnstoffkonzentration hält die Akkumulation von Trimethylaminen nicht Schritt, und es sind durch die Zellvolumenänderungen Störungen des Zellstoffwechsels zu erwarten. Die Bestimmung der h-sgk kann eine Imbalance zwischen destabilisierendem Harnstoff und stabilisierenden Tri-

methylaminen aufdecken. Gegebenenfalls wäre die therapeutische Applikation von Trimethylaminen bei stark unterdrückter h-sgk angezeigt.

Hyperkatabolismus: In einer Reihe kataboler Zustände, wie Sepsis, Verbrennungen, akuter Pankreatitis, schweren Operationen konnten Änderungen des Muskelzellvolumens nachgewiesen werden, die mit dem Ausmaß an Hyperkatabolismus korrelierten. Zellschrumpfung führt in der Tat zur Steigerung und Zellschwellung zur Hemmung der Proteolyse. Die Bestimmung der h-sgk könnte im Einzelfall den Einsatz von therapeutischen Maßnahmen rechtfertigen, die geeignet sind, der Zellschrumpfung entgegenzuwirken, wie die Applikation von Glutamin [Häussinger et al., Lancet, 341: 1330-1332, 1993] oder von Osmolyten [Burg, M.B.J. Exp. Zool. 268(2):171-5, 1994].

Hepatische Encephalopathie: Es gibt überzeugende Beweise dafür, daß die hepatische Encephalopathie durch Schwellung von Gliazellen zustande kommt [Norenberg, M.D., Exp. Neurol. 53(3): 213-220, 1994]. Tatsächlich läßt sich bei Lebererkrankungen eine Abnahme des Osmolyten Inositol im Gehirn nachweisen [Kreis et al., NMR Biomed. 4: 109-116, 1991]. Das völlige Verschwinden koinzidiert mit dem Eintreten einer Encephalopathie. Durch Entwicklung und Einsatz geeigneter Substrate für die h-sgk könnte die h-sgk-Aktivität im Gehirn gemessen und bereits vor Auftreten der Encephalopathie gegengesteuert werden. Gegebenenfalls könnte auch die h-sgk-Expression in besser zugänglichen Geweben als Indikator für Volumenänderungen in Gliazellen herangezogen werden.

Alzheimersche Krankheit: Neue Hinweise deuten auf eine Zunahme des Volumens peripherer Zellen bei der Alzheimerschen Erkrankung hin. Darüberhinaus ist der Osmolyt Inositol bei Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung erhöht, nicht jedoch bei einer Demenz anderer Genese. Die h-sgk-Expression kann somit zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung beitragen.

Infektionen/Entzündungen: Bei einer Sepsis kommt es zu massiver Zellschrumpfung [Häussinger et al., Lancet 1993, 341: 1330-1332] mit entsprechendem Auftreten von Hyperkatabolismus. Tatsächlich spielt beim Pathogen-Wirt-Verhältnis das Zellvolumen eine wichtige Rolle. Die Expression der h-sgk könnte ein wertvoller Parameter zur Abschätzung der Pathophysiologie von Infektionen sein. In-Situ-Hybridisierungsexperimente zeigen einen deutlichen Anstieg der Gewebekonzentration der h-sgk bei entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise Hepatitis, Pankreatitis, Morbus Crohn oder Glomerulonephritis. Darüberhinaus wird die h-sgk-Expression durch TGF β gesteigert, was mit einer progressiven Fibrose, wie beispielsweise Leberzirrhose, Lungenfibrose oder progressiver Niereninsuffizienz, in Zusammenhang gebracht wurde. Tatsächlich wurde gefunden, daß die h-sgk-Expression bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erhöht ist.

Hyperglykämie-Hypoglykämie-Laktazidose:

Eine herabgesetzte oder gesteigerte Expression und/oder Funktion der h-sgk könnte zu Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels führen, wie sie bei Zellschrumpfung und Zellschwellung beobachtet wird [Lang et al., Pflügers Arch. 413: 209-216, 1989]. Eine herabgesetzte Funktion hätte zur Folge, daß eine Hypoglykämie droht. Eine gesteigerte Funktion könnte einerseits Hyperglykämie, andererseits Laktazidose nach sich ziehen. Bei der diagnostischen Abklärung von Hyperglykämie, Hypoglykämie und Laktacidosen unklarer Genese könnte daher immer auch die h-sgk Expression und Funktion untersucht werden.

Die vorliegende Erfindung wird außerdem durch die folgende detaillierte Beschreibung näher erläutert und darüberhinaus durch die Beispiele sowie die Patentansprüche beschrieben.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

20 Materialien und Methoden

Materialien: Fötale Kälberserum und DMEM (Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium) wurden von GIBCO/BRL (Eggenstein, Deutschland) bezogen, Enzyme von STRATAGENE (Heidelberg, Deutschland) und BOEHRINGER MANNHEIM (Mannheim, Deutschland), α -[³⁵S]-dATP von ICN (Eschwege, Deutschland), SuperScript[®] reverse Transcriptase von GIBCO/BRL PCR[®] (Polymerasekettenreaktionen) wurden in einem Crocodile[®] II Thermocycler (APPLIGENE ONCOR, Heidelberg, Germany) mit Hilfe von Prime Zyme[®] DNA polymerase und PCR Puffer von BIOMETRA (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. RAP-PCR Primer wurden von STRATAGENE, Sequenzierprimer von MWG (Ebersberg, Deutschland) erworben. Manuelle Sequenzierung wurde auf einem S2-Sequenzierapparat von GIBCO/BRL mit Hilfe des Fidelity[®] DNA Sequenziersystems (APPLIGENE ONCOR) durchgeführt.

Zellkultur: HepG2 humane Hepatomzellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagles Medium (DMEM) mit 5 % CO₂, 5 mM Glucose bei 37°C, pH 7.4 kultiviert, das mit 10% (vol/vol) fötalen Kälberserum (FCS) angereichert war. Vor der RNA-Isolierung wurden die Zellen bis zu 90%iger Konfluenz kultiviert und für 12 Stunden in basalem Eagle Medium (BME, GIBCO/BRL) ohne fötalem Kälberserum gehalten. Die extrazelluläre Osmolarität wurde über Zugabe bzw. Wegnahme definierter Mengen von Kochsalz ohne Änderungen der anderen Komponenten des BME-Mediums variiert. In Experimenten, in denen die Wirkungen von Aminosäuren geprüft wurden, wurden die Zellen zwei Stunden vor Zugabe der Aminosäuren in einer aminosäurefreien extrazellulären Lösung gehalten.

RAP-PCR: RNA fingerprinting PCR (RAP-PCR) wurde wie früher beschrieben [McClelland et al. 1994, Nucleic Acids Res. 22, 4419-4431] durchgeführt. Nach Elektrophorese durch ein 4% Acrylamid / 7M Harnstoff Polyacrylamid-Gel, wurden die PCR-Produkte durch

Silberfärbung sichtbar gemacht [Sanguinetti et al., Bio-techniques 17, 914-921, 1994]. Alle Banden, die nur unter einer Bedingung (hyperton oder hypoton) sichtbar waren, wurden in der Folge durch reverse Transkription und PCR mit RNA aus neuen Kulturen bestätigt. Die RAP-PCR wurde mit vier verschiedenen Primerpaaren für die cDNA Synthese und PCR Amplifizierung durchgeführt. Zusätzlich wurden unterschiedliche Temperaturen zwischen 30°C und 40°C in der ersten Runde der Amplifizierung gewählt. Zusammen mit diesen Modifikationen wurden insgesamt 64 PCR-Durchgänge durchgeführt.

Die Gewinnung der Banden: Banden, die reproduzierbare Unterschiede zeigten, wurden unter sterilen Bedingungen ausgeschnitten. Das Amplicon wurde über Nacht bei 70 °C in 100 µl Puffer (50 mM KCl, 10mM TRIS-Cl pH 9.0, 0.1% Triton X 100) eluiert. Reamplifizierung durch PCR wurde mit 3.0 µl Eluat durchgeführt, mit geeigneten Primer (250 nM), 200 µM dNTP, 1x salzarmem Puffer (STRATAGENE) mit 1.5 mM MgCl₂ und 5 Einheiten Taq⁺ DNA Polymerase (STRATAGENE) bei folgenden Temperatur-Zyklusprofilen: Ein Zyklus bei 95 °C für 60 sec, 30 Zyklen bei 95 °C (15 sec), 55 °C (15 sec), 72 °C (60 sec) und zuletzt bei 72 °C für 5 Minuten. Nach Bestätigung durch PAGE, daß nur ein definiertes Amplicon mit der erwarteten Länge erzeugt worden war, wurde dieses Amplicon direct für die Bildung der Probe verwendet.

Northern Analyse: Digoxigenin (DIG)-gekoppelte Proben wurden durch direktes PCR-labeling der unterschiedlichen Amplicons erzeugt, mit Hilfe der geeigneten Primer und den Bedingungen, wie sie oben beschrieben wurden, außer, daß folgende dNTP Konzentrationen verwendet wurden: 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 190 µM dTTP und 10 µM DIG-dUTP (BOEHRINGER). Northern blots wurden mit 20 µg totaler RNA oder mit 2 µg poly(A)-RNA hergestellt, die durch 1% Agarose Gele in Anwesenheit von 2.2M Formaldehyd elektrophoretisch getrennt worden waren. Äquivalentes Laden von Proben bei der Untersuchung von poly(A)-RNA wurde durch Färbung mit Ethidiumbromid der ribosomalen RNA Banden oder durch DIG-gelabelte Antisense-RNA probe gegen das humane heterogene nuclear ribonucleoprotein C1 als internem Standard überprüft. Die Größe der RNA wurde mit dem DIG-gelabelten Molekulargewicht-Marker I (BOEHRINGER) abgeschätzt. Vacuum blotting (APPLIGENE ONCOR Trans DNA Express Vacuum Blotter) wurde zum Transfer auf positiv geladene Nylonmembranen (BOEHRINGER) eingesetzt, die dann durch Ultraviolett-Licht vernetzt wurden (STRATAGENE UV Stratalinker® 2400). Hybridisierung wurde über Nacht in DIG-Easy-Hyb® (BOEHRINGER) bei einer Probenkonzentration von 25 ng/ml oder 100 ng/ml bei 50 °C oder 65 °C für DNA - Proben oder RNA - Proben durchgeführt. Proben, die unterschiedliche Expression zeigten, wurden mit dem pCR-Script SK(+) Cloning Kit (STRATAGENE) subkloniert und in Northern blots überprüft. Die im fol-

genden gezeigten Northern blots wurden von diesen Subclones abgeleitet.

Weitere Methoden: DNA Sequenzierung vom pCR clone wurde mit dem Fidelity® DNA Sequencing System (APPLIGENE ONCOR) durchgeführt. Sequenzierungsprodukte wurden mit α-[³⁵S]-dATP markiert und auf einem 6% Polyacrylamide / 8M Harnstoff Sequenzierungsgel aufgetrennt. Die GenBank-Daten wurden nach homologen Sequenzen mit dem FASTA computer program [Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448] abgesucht. Die Sequenz der vollständigen h-sgk cDNA wurde mit Hilfe des I.M.A.G.E. Consortium Clone ID 42669 von der TIGR/ATCC Special Collection of Human cDNA Clones gewonnen. Die Gendaten wurden mit Hilfe des European Molecular Biology Laboratory EMBL (Heidelberg), dem BLAST network service und - für die Protein alignments - dem BLITZ server an der neuesten Ausgabe der SwissProt protein database untersucht.

Nucleotidsequenz-Zugangsnummer: Die h-sgk cDNA-Sequenz wurde in die GenBank-Database unter der Zugangsnummer Y10032 eingegeben und bis zum 1. März 1997 gesperrt.

Ergebnisse

Differentielle Genexpression in HepG2-Zellen in hypotoner, isotoner und hypertoner extrazellulärer Flüssigkeit: mRNA wurde von HepG2 Zellen isoliert, die für 1 oder 2 Stunden mit hypotoner (hypoton I: minus 100 mosmol/l durch Entfernung von 50 mM NaCl und hypoton II: minus 50 mosmol/l durch Entfernung von 25 mM NaCl im Vergleich mit isotonom Kontrollmedium), isotoner (mit gesamter Osmolarität von 290 mosmol/l und einer NaCl - Konzentration von 114 mM) oder hypertoner (plus 50 mosmol/l durch Zugabe von 50 mM Raffinose) Medium vorbehandelt wurden. Die mRNA wurde als Template für die RAP - PCR mit arbiträren Primern verwendet. Die Produkte der RAP - PCR wurden auf denaturierten Polyacrylamid-Gele aufgetragen und zum Vergleich in parallelen Bahnen aufgetrennt. Mehrere Banden zeigten differentielle Expression bei Verwendung mehrerer Primer. Vier differentielle Banden der RAP-PCR Gele wurden weiter analysiert: Zwei erwiesen sich bei der folgenden Northern blot Analyse als falsch positiv, eine Bande wurde durch hypotone und hypertone Bedingungen gesteigert, aber ihre Sequenz zeigte keine Ähnlichkeit zu irgend einem bisher bekannten klonierten Gen. Eine Bande von etwa 500 Basenpaaren zeigte eine zunehmende Expression mit zunehmender extrazellulärer Osmolarität (hypoton I - hypoton II - isoton - hyperton). Diese Bande wurde aus dem Gel gereinigt und mit Hilfe von Primer RAP-A4 reamplifiziert. Nach Markierung mit Digoxigenin durch PCR, wurden Northern blots mit diesem Amplicon angefertigt, um die differentielle Expression in verschiedenen Zellpräparationen zu bestätigen, die für zwei Stunden mit hypotonem I, isotonem und hypertonomem

Medium vorbehandelt worden waren.

Ein einzelnes Transcript von etwa 2.6 Kilobasen war in hohem Maße durch die Änderungen der extrazellulären Osmolarität beeinflusst (Abb. 1). Die Transkriptmenge wurde bei Abnahme der Osmolarität gesenkt und bei Zunahme der Osmolarität gesteigert.

Klonierung und Sequenzierung des differentiell regulierten h-sgk Gens. Das 500 Basenpaare lange PCR-Produkt wurde in den PCR II Vektor subkloniert und eine neue Probe mit diesem Konstrukt erzeugt, um eine Identität zwischen dem ursprünglichen und dem subklonierten DNA-Fragment nachzuweisen. Rehybridisierung eines Northern blots mit dieser Probe führte zu identischen Ergebnissen wie die ursprüngliche Probe. Zusätzlich wurde eine Southern blot - Analyse mit dem neuen Konstrukt durchgeführt und mit dem ursprünglichen Konstrukt hybridisiert. Eine starke Hybridisierung nach zwei high stringency washes bestätigte die Identität der Sequenz.

Sequenzanalysen in beide Richtungen zeigten die Anwesenheit der verwendeten Primer an beiden Seiten des Amplicons. Eine Aminosäuresequenz, die von einem Leserahmen der Nucleotidsequenz translatiert wurde, zeigte eine 95 %ige Identität zur carboxyterminalen Aminosäuresequenz der Ratten-sgk (serum and glucocorticoid regulated protein kinase), einem neuen Mitglied der Serin/Threonin-Proteinkinase Proteinfamilie, das aus einer Ratten- Brustdrüsen-Tumorzelllinie geklont wurde [Webster et al., Mol. Cell. Biol. 13, 2031-2040, 1993a]. Wegen der hohen Ähnlichkeit wurde die Bezeichnung h-sgk (human-) für das neue Protein gewählt.

Die Genbank-Database wurde auf ähnliche menschliche Sequenzen mit dem FASTA Computerprogramm durchsucht. Mehrere EST (Expressed Sequence Tags) DNA Sequenzen aus der TIGR/ATCC Special Collection of Human cDNA Clones zeigten 100 % Sequenzübereinstimmung mit Teilen der h-sgk cDNA Fragmente. Nach vielfachen alignments von 30 verschiedenen TIGR/ATCC humanen cDNA Klonen mit der Ratten-sgk-cDNA-Sequenz (Genbank Zugangsnummer L01624) und mit dem h-sgk DNA Fragment, wurde angenommen, daß das I.M.A.G.E. Consortium Konstrukt mit dem Clone ID 42669 einer menschlichen Kinderhirn-Library die vollständige kodierende Sequenz der h-sgk aufweist. Sequenzanalyse dieses Konstruktes mit übereinstimmenden Sequenzen in Sense- und Antisense-Richtung ergab eine cDNA Sequenz von etwa 2.4 Kilobasen. Um die Beteiligung der vollständigen h-sgk nachzuweisen, wurde das 5' Ende des Klon (Nucleotide 1 - 285 der kodierenden Sequenz) in den PCR II vector subkloniert und damit eine neue Probe mit diesem Konstrukt erzeugt. Hybridisierung eines Northern blots mit dieser Probe resultierte in identischen Ergebnissen wie die ursprünglichen Proben (Abb. 1). Der längste Leserahmen des untersuchten Klon (1.3 kb) ergab ein 431-Aminosäure-Protein mit einer Identität von insgesamt 98 % zu dem Ratten-sgk Protein.

Regulation der h-sgk Expression durch Änderungen der extrazellulären Osmolarität: Um den Einfluß von Änderungen der extrazellulären Osmolarität auf die h-sgk-Transkriptmengen zu untersuchen, wurden HepG2 Zellen unterschiedlich lang in hypotonem (190 mosmol/l), isotonem (290 mosmol/l) und hypertonem (390 mosmol/l) BME Medium ohne FCS inkubiert. Die h-sgk mRNA Konzentrationen nahmen binnen 60 min in hypotoner Lösung stark zu. Der erste Anstieg war innerhalb von 30 Minuten erkennbar und erreichte ein Maximum innerhalb von zwei Stunden. Die Induktion der h-sgk folgt daher unmittelbar nach Änderung der Osmolarität. Die Transkriptkonzentrationen stiegen binnen 4 bis 8 Stunden in hypertonem extrazellulären BME-Medium weiter an, und fielen dann allmählich wieder innerhalb der folgenden 16 bis 24 Stunden auf die Ausgangskonzentrationen ab. Andererseits fielen die h-sgk-Transkriptkonzentrationen in hypotoner extrazellulärer Lösung schnell ab, wobei der Abfall bereits nach 30 Minuten erkennbar war und ein Maximum innerhalb von zwei Stunden erreicht wurde.

Unterschiedliche Osmolaritäten (140, 190, 240, 290, 340, 390 und 440 mosmol/l) zeigten binnen zwei Stunden unterschiedliche Expressionen der h-sgk. Über dem gesamten Bereich war eine steile Korrelation der h-sgk Expression mit der extrazellulären Osmolarität nachweisbar. Eine 30%ige Zunahme der Osmolarität ging in etwa mit einer Verdreifachung der Kinaseexpression einher. Eine Zunahme der Osmolarität von 290 auf 340 mosmol/l, und eine Abnahme der Konzentration von 290 auf 240 mosmol/l induzierten signifikante Änderungen der h-sgk Expression. Der transkriptionelle Kontrollmechanismus reagiert also offenbar sehr empfindlich auf Änderungen der Osmolarität. Die Induktion der h-sgk-RNA war unabhängig von einer de novo Proteinsynthese. Der Anstieg der Transkriptkonzentration in hypertonem BME Medium ist in Anwesenheit des Proteinsynthesehemmers Cycloheximid (10 µg/ml) größer als in Abwesenheit des Hemmstoffes.

Die schnelle Abnahme der h-sgk Transkriptkonzentrationen gleich nach Senkung der extrazellulären Osmolarität legt eine kurze Halbwertszeit der h-sgk-mRNA nahe. Um die Abnahmerate der h-sgk Transkriptkonzentrationen zu untersuchen, wurden HepG2 Zellen für zwei Stunden mit hypertonem Medium (390 mosmol/l) behandelt, um einen maximalen Anstieg der h-sgk Transkriptkonzentrationen zu erzielen. Dann wurde ein Teil der Zellen dem RNA-Polymerasehemmer Actinomycin D (5 µg/ml) ausgesetzt, der andere Teil der Zellen hypotonem Medium (190 mosmol/l). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde RNA präpariert und die Transkriptkonzentrationen der beiden Zellgruppen verglichen. Actinomycin D Behandlung führte zu einem schnellen Abfall der h-sgk Transkriptkonzentrationen mit einer geschätzten Halbwertszeit von etwa 30 Minuten. Behandlung der Zellen mit hypotonem extrazellulären Medium führte zu einem gleichermaßen schnellen Abfall der Transkriptkonzentrationen.

Regulation der h-sgk Transskriptkonzentrationen durch isotone Zellvolumen-Änderungen. Um zwischen den Wirkungen von Änderungen des Zellvolumens, der Ionenstärke und der Osmolarität unterscheiden zu können, wurde das Zellvolumen durch zwei verschiedene Methoden bei gleichbleibender Ionenstärke und Osmolarität manipuliert. Binnen zwei Stunden isotoner Zellschrumpfung durch Hemmung des NaCl/KCl-Kotransporters und des Na⁺/H⁺-Austauschers mit Bumetanid und 3-Methylsulfonyl-4-(1-piperidino)-benzoylguanidin (EP-0 416 499) war die Expression der h-sgk gesteigert, eine Wirkung, die durch zusätzliche Zunahme der extrazellulären Osmolarität noch verstärkt wurde. Zellschwellung durch Angebot von verschiedenen Aminosäuren (Aminosäure-Mischung von 1x BME Aminosäuren, GIBCO/BRL) führte umgekehrt binnen zwei Stunden zu einem Abfall der h-sgk-Transskript-Konzentrationen. Es ist also das Zellvolumen, nicht die Osmolarität oder die Ionenstärke, welches die Expression der h-sgk reguliert.

Um zu prüfen, ob die Expression der h-sgk in HepG2 Zellen, ähnlich wie die der Ratten-sgk in Brustdrüsentumorzellen [Webster, M.K. (1993) Mol. Cell. Biol. 13, 2031-2040.] durch Glucocorticoide oder fötales Kalberserum (FCS) reguliert wird, wurden HepG2 Zellen mit Dexamethason (1 µM) oder mit FCS (10 %) für zwei bis 12 Stunden inkubiert. In Northern blots konnte kein Einfluß von Glucocorticoiden oder FCS auf die Transskript-Konzentrationen von h-sgk in HepG2-Zellen gefunden.

Regulation der sgk Transskriptkonzentrationen durch die extrazelluläre Osmolarität in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen. Um zu prüfen, ob die beobachtete Zellvolumen-Abhängigkeit der Expression von h-sgk eine Besonderheit der HepG2-Zellen ist, wurden die Hunde-Nierenepithelzellen MDCK für zwei Stunden hypotonem (190 mosmol/l) und hypertonem (390 mosmol/l) BME Medium ausgesetzt. h-sgk-Transskripte mit einer Länge von etwa 2.6 Kilobasen konnten auch nach mehreren High-Stringency-Waschschritten mit 0.5 x SSC (standard saline citrate) bei 65 °C nachgewiesen werden, ein Hinweis auf hohe Sequenzhomologie der sgk-Gene zwischen verschiedenen Species. Änderungen der extrazellulären Osmolarität übten in MDCK-Zellen einen ähnlichen Einfluß auf die Transskriptkonzentrationen aus wie in HepG2-Zellen.

Gewebsspezifische Expression der h-sgk. Ein vorgefertigter Multiple Tissue Northern Blot (CLONTECH, Heidelberg, Germany) wurde mit der h-sgk DNA Probe untersucht. Die h-sgk Expression zeigt eine gewisse Gewebsspezifität, mit höchster Expression in Pankreas, Leber, und Herzmuskel. Eine etwas geringere Expression zeigt sich in Placenta, Lunge und Skelettmuskel. Niedrige aber erkennbare Expressionen finden sich in Gehirn und Niere. In menschlichem Gehirngewebe ist die Expression in der substantia nigra und dem corpus callosum am höchsten, in den corpora

amygdala, Hippocampus, nucleus caudatus und nucleus subthalamicus durchschnittlich und im Thalamus am geringsten. Interessanterweise wurde ein zweites Transskript von 7 Kilobasen in fast allen Geweben gefunden, mit höchster Expression im Pankreas. Dieses Transskript ist möglicherweise eine weitere h-sgk-mRNA durch alternatives splicing oder ein zur h-sgk homologes Gen. Das 7 Kilobasen-Transcript war in HepG2 Northern blots nicht gefunden worden.

Regulation der h-sgk Expression durch Harnstoff: Die h-sgk-Expression ist durch die Anwesenheit von Harnstoff im Extrazellulärraum unterdrückt. Die Expression der h-sgk war bei 50 mmol/l Harnstoff mäßig, bei 100 mmol/l Harnstoff massiv eingeschränkt.

Diskussion

Die h-sgk, ein humanes Gen, dessen Transskription durch Änderungen des Zellvolumens reguliert wird, kodiert für eine putative Serin/Threonin-Proteinkinase mit hoher Sequenzhomologie zu Ratten-sgk, die kürzlich als Serum- und Glucocorticoid-reguliertes Gen von Ratten-Brustdrüsen-Tumorzellen, als Läsions-induziertes Gen nach ZNS-Läsionen im Rattenhirn [Imazumi et al., Mol. Brain Res. 26, 189-196, 1994] und als Testosteron- und Follikel-stimulierendes Hormon-induziertes Gen in Granulosa-Zellen des Ratten-Ovars [Richards et al., Recent Prog. Horm. Res. 50, 223-254, 1995] beschrieben wurde. Das 49 kD h-sgk Protein zeigt annähernd 98 % Homologie mit dem Ratten sgk Protein mit weitgehend konservativen Aminosäureaustauschen. Es weist etwa 50% Homologie in seiner katalytischen Domäne mit mehreren Kinasen der "second messenger" Familie auf, wie rac Protein-kinase, Protein kinase C, ribosomale protein S6 kinase, and cAMP-abhängige Protein kinase [Webster et al., (1993b) J. Biol. Chem. 268, 11482-11485; Webster et al., (1993a) Mol. Cell. Biol. 13, 2031-2040].

Der Expressionsgrad des 2.6 Kilobasen h-sgk Transskripts in HepG2 Zellen wird in hohem Maße durch Änderungen der extrazellulären Osmolarität beeinflusst. Gesteigerte Transkript-Konzentrationen konnten binnen 30 Minuten nach Zunahme der extrazellulären Osmolarität gefunden werden. Diese Induktion war unabhängig von einer de novo Protein-Synthese. Die Transkriptkonzentrationen sinken binnen 30 Minuten nach Senkung der extrazellulären Osmolarität. Der Abfall war gleichermassen schnell wie der Abfall nach Hemmung der Transkription durch Aktinomycin D.

Zellvolumenänderungen beeinflussen demnach die Transkriptionsrate von h-sgk. Die herabgesetzte h-sgk Transkriptionsrate nach osmotischer Zellschwellung und die kurze Halbwertszeit gewährleisten eine schnelle und effiziente Regulation der Transskript-Konzentrationen von h-sgk RNA in HepG2 Zellen.

Isosmotische Änderungen des Zellvolumens beeinflussen gleichermassen die h-sgk-Expression. Zellschrumpfung wurde durch Hemmung der wesentlichen

Ionentransportmechanismen Na^+ / H^+ -Austauscher und NaCl / KCl -Cotransporter durch deren spezifische Blocker 3-Methylsulfonyl-4-(1-piperidino)-benzoylguanidin (EP-0 416 499) und Bumetanid erreicht. Zellschwellung wurde durch die Zugabe von Aminosäuren und die folgende hepatozelluläre Akkumulierung der Aminosäuren über Na^+ -abhängige Aminosäuretransporter wie etwa System A, N, und ASC bewirkt. Die Transkriptkonzentrationen korrelierten mit dem Zellvolumen, nicht mit der Osmolarität.

Nach langanhaltender osmotischer Zellschrumpfung nahmen die Transkriptkonzentrationen innerhalb der ersten halben Stunde steil zu und blieben dann für 8 Stunden erhöht, bevor sie wieder allmählich abnahmen. Diese langanhaltende Zunahme steht im scheinbaren Widerspruch zum schnellen Zeitgang der Zellvolumenregulation. Osmotisch geschrumpfte oder geschwollene Leberzellen regulieren ihr Zellvolumen jedoch nicht völlig, sondern bleiben nach der schnellen Phase der Volumenregulation noch mässig geschrumpft bzw. geschwollen [Häussinger et al., (1994) *Am. J. Physiol.* 267, E343-E355].

Die verbleibenden Zellvolumenänderungen könnten für die veränderte Expression der h-sgk verantwortlich sein.

Neben dem Zellvolumen selbst übt Harnstoff einen massiven Einfluß auf die Expression der h-sgk aus. Harnstoff übt eine destabilisierende Wirkung auf Proteine aus und imitiert auf diese Weise die Wirkung einer Zellschwellung. Die h-sgk wäre somit ein Sensor der Proteinstabilität bzw. der Packungsdichte der zellulären Makromoleküle. Die destabilisierende Wirkung von Harnstoff wird durch die Bildung von Trimethylaminen abgeschwächt, wodurch wahrscheinlich die destabilisierende Wirkung von Harnstoff bei Niereninsuffizienz abgeschwächt wird.

Die zellulären Wirkungen der h-sgk sind noch unsicher. Insbesondere läßt sich derzeit noch nicht mit Sicherheit feststellen, ob die Wirkungen der h-sgk eine Rolle für die Zellvolumenregulation spielen. Für einen Einsatz der h-sgk als Diagnostikum ist die Wirkung der h-sgk jedoch belanglos.

Trotz der auffälligen Sequenzhomologie zur Rattensgk konnten wir keine Parallelen zur Regulation der Rattensgk feststellen. Weder Serum (FCS) noch Glucocorticoide (Dexamethason), die beide in Ratten-Brustdrüsen-Tumorzellen einen starken Einfluß auf die sgk Transcription gezeigt hatten, beeinflussten die Expression von h-sgk in HepG2 Zellen. In den verschiedenen Zelltypen scheinen daher unterschiedliche h-sgk Promotersequenzen die Expression des Proteins zu regulieren. Es ist also denkbar, daß die Expression der h-sgk nicht ausschließlich durch das Zellvolumen bzw. die Packungsdichte reguliert wird. Eine Zellvolumen-Abhängigkeit der h-sgk Expression konnten wir auch in Nierenepithelzellen (MDCK) und in Makrophagen nachweisen. Die Zellvolumenabhängigkeit der h-sgk-Expression ist also keine Besonderheit der HepG2 Zel-

len. Die h-sgk 5'flankierenden Sequenzen in den verschiedenen Zellen könnten die regulierenden Elemente aufdecken, die für die unterschiedliche Expression der sgk Transskripte verantwortlich sind. Wie die früher beschriebene Glucocorticoid- und Serum induzierte Expression von sgk in der Ratte benötigt die Zellvolumen induzierte Expression der h-sgk RNA nur 30 Minuten. Die Halbwertszeit der h-sgk Transskripte in HepG2 Zellen ist mit 30 Minuten ebenso kurz wie die sgk Halbwertszeit in Ratten-Brustdrüsentumorzellen, wie die Experimente mit dem RNA-Polymerasehemmer Actinomycin D zeigen.

Das h-sgk-Transskript wird in allen bisher untersuchten menschlichen Geweben exprimiert. Besonders hoch ist die Expression in Pankreas und Leber, möglicherweise aufgrund der spezialisierten Epithelfunktion dieser Gewebe.

Proteinphosphorylierung ist ein schneller und reversibler Mechanismus, um Signale aus dem Extrazellulärraum in die Änderungen von einer Vielzahl von Zellfunktionen umzusetzen. Die h-sgk-Proteinkinase könnte durch Phosphorylierung spezifischer Proteine einen Teil der zellvolumenregulatorischen Mechanismen auslösen und ein bisher unbekanntes Bindeglied zwischen zellulärer Hydratation und Zellfunktion darstellen.

Beispiele:

1. Durchführung der Northern Hybridisierungen:

10-20 mg Gesamt-RNA bzw. 1-2 mg poly(A)-RNA wurden elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel in Gegenwart von 2.2M Formaldehyd aufgetrennt. Der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte mit Hilfe eines Vacuum Blotters mit 10x SSC als Transferpuffer für einen Zeitraum von zwei Stunden. Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung mit kontrollierter Leistung kovalent an die Membran quervernetzt. Die Hybridisierung der spezifischen Sonde (25ng/ml) wurde bei 50°C über Nacht durchgeführt in einem speziell für den Zweck der nichtradioaktiven Hybridisierung entwickelten Puffer (DIG Easy Hyb, BOEHRINGER). Die dabei verwendete Sonde wurde mittels der Polymerasen Ketten Reaktion aus dem 3'Ende der kodierenden Sequenz der betreffenden h-sgk (Nucleotid 980-1480) amplifiziert und gleichzeitig durch Einschluß von DIG-dUTP im Reaktionspuffer markiert. Nach zweimaligem Waschen der Blots in 2x SSC bei Raumtemperatur und in 0.5x SSC bei 65°C erfolgte die Detektion der markierten Sonde durch einen ELISA mit einem Anti-Digoxigenin Antikörper, dessen angekoppelte alkalische Phosphatase eine Chemolumineszenzreaktion in CDP-Star (BOEHRINGER) erzeugte, die autoradiographisch festgehalten wurde (durchschnittliche Expositionszeit ca. zwei Minuten).

2. Western Blot Analyse:

Details zur Antikörperherstellung: Zur Immunisierung der Kaninchen wurden zwei Peptide aus der h-sgk-Aminosäuresequenz verwendet: Pos.386-Pos.404 (DPEFTEEPVPNSIGKSPDS), Pos.416-Pos.431 (EAFLGFSYAPPTDSFL). Beide Peptide wurden mit KLH bzw. mit MAP als Carrier konjugiert und mit komplettem bzw. inkomplettem Freund'schen Adjuvans intracutan injiziert. Das Injektions- und Blutungsprotokoll folgte den Standardvorschriften. Die Immunsereen wurden affinitätschromatographisch gereinigt, und die Antikörperfraktionen wurden bei einer Konzentration von ca. 1 mg/ml aufgefangen und verwendet.

Immunoblot-Analyse: Ca. 60mg zelluläres Gesamtprotein wurden elektrophoretisch durch ein SDS-7.5% Polyacrylamid Gel fraktioniert und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Membranen wurden über Nacht in 3% BSA - 5% Trockenmilch - 0.06% Tween 20 in PBS blockiert. Primärer (affinitäts-gereinigter anti-h-sgk) und sekundärer (horseradish-Peroxidase konjugierter goat anti-rabbit IgG, Bio-Rad) wurden für je eine Stunde bei Raumtemperatur in 3% BSA-0.06% Tween in PBS inkubiert. Für die Immunodektektion wurde ein Enhanced Chemolumineszenz Kit (ECL, Amersham) verwendet.

3. In Situ-Hybridisierung:

15 mm Gefrierschnitte wurden für 20 Minuten in Formaldehyd 4% nachfixiert, gefolgt von zwei Waschschritten in 100mM Phosphatpuffer pH 7.2 von jeweils 5 Minuten. Nach einer Proteinase K Behandlung (1mg/100ml) folgte eine 10 minütige Inkubation in 0.1M Triethanolamin / 0.225% Essigsäure. Erneut wurde mit 100 mM Phosphatpuffer gewaschen und die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Prähybridisierung erfolgte bei 50 °C im Hybridisierungspuffer, die Hybridisierung wurde über Nacht durchgeführt. Die verwendete Sonde entspricht der Sonde, die bei den Northern Blots beschrieben wurde. Die Detektion erfolgte durch enzymatische Spaltung einer X-Phosphatlösung, katalysiert durch eine anti-digoxigenin-antikörper-gekoppelte alkalische Phosphatase.

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, kodierend für die humane zellvolumenregulierte Kinase h-sgk mit der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 2.
2. Nukleinsäure mit der Nukleotidsequenz gemäß Fig. 1.
3. Nukleinsäure, die mit der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert und die für eine funktionell aktive zellvolumenregulierte Kinase kodiert, deren Transskript-

ion weder mit fötalem Kälberserum (FCS) noch einem Glucocorticoid induzierbar ist.

4. Nukleinsäure, die mit der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert und die für eine funktionell aktive zellvolumenregulierte Kinase kodiert, welche nicht identisch ist mit der Ratten-sgk.

5. Nukleinsäurefragmente, enthaltend ungefähr den Bereich von Nukleotid Position 980 bis 1480 der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder 2.

6. Nukleinsäurefragmente, kodierend für immunologisch aktive Fragmente der humanen zellvolumenregulierten Kinase h-sgk.

7. Nukleinsäurefragmente gemäß Anspruch 6, kodierend für Fragmente mit mindestens einer der folgenden Aminosäuresequenzen:

DPEFTEEPVPNSIGKSPDS (1)
EAFLGFSYAPPTDSFL (2)

8. Humane zellvolumenregulierte Kinase h-sgk oder Fragmente davon, erhältlich durch rekombinante Expression der Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7.

9. Humane zellvolumenregulierte Kinase h-sgk mit der Aminosäuresequenz gemäß Fig. 2.

10. Immunogenes Peptid mit mindestens einer der folgenden Aminosäuresequenzen:

DPEFTEEPVPNSIGKSPDS (1)
EAFLGFSYAPPTDSFL (2)

11. Rezeptoren, die spezifisch an die humane zellvolumenregulierte Kinase h-sgk gemäß Anspruch 8 oder 9 binden.

12. Rezeptoren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie monoklonale oder polyklonale Antikörper sind.

13. Verwendung der Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder eines Fragments dieser Nukleinsäure zum Nachweis einer für die humane zellvolumenregulierte Kinase h-sgk kodierenden Nukleinsäure.

14. Verwendung der Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder eines Fragments dieser Nukleinsäure zum Nachweis einer für die humane zellvolumenregulierte Kinase h-sgk kodierenden Nukleinsäure im Northern blot oder durch Hybridisierung.

15. Verwendung der humanen zellvolumenregulierten Kinase h-sgk gemäß einem der Ansprüche 8 oder 9 oder eines Peptids gemäß Anspruch 10 zum Nachweis von Rezeptoren, welche an die h-sgk binden. 5
16. Verwendung von Rezeptoren gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12 zum qualitativen oder quantitativen Nachweis der humanen zellvolumenregulierten Kinase h-sgk. 10
17. Verwendung gemäß Anspruch 16, beinhaltend ein immunchemisches Verfahren.
18. Verfahren zur Herstellung von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eines der Peptide gemäß Anspruch 10 zur Immunisierung von Versuchstieren verwendet wird. 15
19. Verwendung der Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 oder eines Fragments gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 7 oder der humanen zellvolumenregulierten Kinase h-sgk gemäß Anspruch 8 oder 9 oder der Peptide gemäß Anspruch 10 zum Nachweis von Zellvolumenänderungen. 20 25
20. Arzneimittel, enthaltend die Nukleinsäure gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 oder ein Fragment gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 7 oder die humane zellvolumenregulierte Kinase h-sgk gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8 und 9 oder ein Peptid gemäß Anspruch 10 oder Rezeptoren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 11 und 12. 30 35
- 40
- 45
- 50
- 55

Fig. 1

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CACGAGGGAG CGCTAACGTC TTTCTGTCTC CCGCGGTGG TG ATG ACG GTG AAA	54
Met Thr Val Lys	
1	
ACT GAG GCT GCT AAG GGC ACC CTC ACT TAC TCC AGG ATG AGG GGC ATG	102
Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg Val Arg Gly Met	
5 10 15 20	
GTG GCA ATT CTC ATC GCT TTC ATG AAG CAG AGG AGG ATG GGT CTG AAC	150
Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg Met Gly Leu Asn	
25 30 35	
GAC TTT ATT CAG AAG ATT GCC AAT AAC TCC TAT GCA TGC AAA CAC CCT	198
Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala Cys Lys His Pro	
40 45 50	
GAA GTT CAG TCC ATC TTG AAG ATC TCC CAA CCT CAG GAG CCT GAG CTT	246
Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln Glu Pro Glu Leu	
55 60 65	
ATG AAT GCC AAC CCT TCT CCT CCA CCA AGT CCT TCT CAG CAA ATC AAC	294
Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ser Gln Gln Ile Asn	
70 75 80	
CTT GGC CCG TCG TCC AAT CCT CAT GCT AAA CCA TCT GAC TTT CAC TTC	342
Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser Asp Phe His Phe	
85 90 95 100	
TTG AAA GTG ATC GGA AAG GGC AGT TTT GGA AAG GTT CTT CTA GCA AGA	390
Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Leu Leu Ala Arg	
105 110 115	
CAC AAG GCA GAA GAA GTG TTC TAT GCA GTC AAA GTT TTA CAG AAG AAA	438
His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val Leu Gln Lys Lys	
120 125 130	
GCA ATC CTG AAA AAG AAA GAG GAG AAG CAT ATT ATG TCG GAG CGG AAT	486
Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met Ser Glu Arg Asn	
135 140 145	
GTT CTG TTG AAG AAT GTG AAG CAC CCT TTC CTG GTG GGC CTT CAC TTC	534
Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val Gly Leu His Phe	
150 155 160	
TCT TTC CAG ACT GCT GAC AAA TTG TAC TTT GTC CTA GAC TAC ATT AAT	582
Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu Asp Tyr Ile Asn	
165 170 175 180	
GGT GGA GAG TTG TTC TAC CAT CTC CAG AGG GAA CGC TGC TTC CTG GAA	630
Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg Cys Phe Leu Glu	
185 190 195	

EP 0 861 896 A2

CCA CGG GCT CGT TTC TAT GCT GCT GAA ATA GCC AGT GCC TTG GGC TAC Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Tyr 200 205 210	678
CTG CAT TCA CTG AAC ATC GTT TAT AGA GAC TTA AAA CCA GAG AAT ATT Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile 215 220 225	726
TTG CTA GAT TCA CAG GGA CAC ATT GTC CTT ACT GAT TTC GGA CTC TGC Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp Phe Gly Leu Cys 230 235 240	774
AAG GAG AAC GAA CAC AAC AGC ACA ACA TCC ACC TTC TTT GAG ACG Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr 245 250 255 260	822
CCG GAG TAT CTC GCA CCT GAG GTG CTT CAT AAG CAG CCT TAT GAC AGG Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln Pro Tyr Asp Arg 265 270 275	870
ACT GTG GAC TGG TGG TGC CTG GGA GCT GTC TTG TAT GAG ATG CTG TAT Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr Glu Met Leu Tyr 280 285 290	918
GGC CTG CCG CCT TTT TAT AGC CGA AAC ACA GCT GAA ATG TAC GAC AAC Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu Met Tyr Asp Asn 295 300 305	966
ATT CTG AAC AAG CCT CTC CAG CTG AAA CCA AAT ATT ACA AAT TCC GCA Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile Thr Asn Ser Ala 310 315 320	1014
AGA CAC CTC CTG GAG GGC CTC CTG CAG AAG GAC AGG ACA AAG CGG CTC Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg Thr Lys Arg Leu 325 330 335 340	1062
GGG GCC AAG GAT GAC TTC ATG GAG ATT AAG AGT CAT GTC TTC TTC TCC Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His Val Phe Phe Ser 345 350 355	1110
TTA ATT AAC TGG GAT GAT CTC ATT AAT AAG AAG ATT ACT CCC CCT TTT Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile Thr Pro Pro Phe 360 365 370	1158
AAC CCA AAT GTG AGT GGG CCC AAC GAG CTA CGG CAC TTT GAC CCC GAG Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Glu Leu Arg His Phe Asp Pro Glu 375 380 385	1206
TTT ACC GAA GAG CCT GTC CCC AAC TCC ATT GGC AAG TCC CCT GAC AGC Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys Ser Pro Asp Ser 390 395 400	1254
GTC CTC GTC ACA GCC AGC GTC AAG GAA GCT GCC GAG GCT TTC CTA GGC Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu Ala Phe Leu Gly 405 410 415 420	1302
TTT TCC TAT GCG CCT CCC ACG GAC TCT TTC CTC TGAACCTGT TAGGGCTTGG Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu 425 430	1355

TTTTAAAGGA TTTTATGTGT GTTTCOGAAT GTTTATAGTTA GCCTTTTGGT GGAGCCGCCA	1415
GCTGACAGGA CATCTTACAA GAGAATTTCG ACATCTCTGG AAGCTTAGCA ATCTTATTGC	1475
ACACTGTTTG CTGGAATTTT TTGAAGAGCA CATTCTCCTC AGTGAGCTCA TGAGGTTTTT	1535
ATTTTATTTC TTCCTTCCAA CGTGGTGCTA TCTCTGAAAC GAGCGTTAGA GTGCCGCCTT	1595
AGACGGAGGC AGGAGTTTCG TTAGAAAGCG GACCTGTTCT AAAAAAGGTC TCCTGCAGAT	1655
CTGTCTGGGC TGTGATGAGC AATATTATGA AATGTGCCCTT TTCTGAAGAG ATTGTGTTAG	1715
CTCCAAAGCT TTTCCTATCG CAGTGTTCCTA GTTCTTTTATT TTCCTTTGTG GATATGCTGT	1775
GTGAACCGTC GTGTGAGTGT GGTATGCCCTG ATCAGAGATG GATTTTGTTA TAAGCATCAA	1835
TGTGACACTT GCAGGACACT ACAACGTGGG ACATTGTTTG TTTCTTCCAT ATTTGGAAGA	1895
TAAATTTATG TGTAGACTTT TTTGTAAGAT ACGGTTAATA ACTAAAATT ATTGAAATGG	1955
TCTTGCAATG ACTCGTATTC AGATGCCTAA AGAAAGCATT GCTGCTACAA ATATTTCTAT	2015
TTTTAGAAAG GGTTTTTATG GACCAATGCC CCAGTTGTCA GTCAGAGCGG TTGGTGTITT	2075
TCATTGTTTA AAATGTCACC TGTAAGATGG GCATTATTTA TGTTTTTTTT TTGCATTCC	2135
TGATAATTGT ATGTATTGTA TAAAGAACGT CTGTACATTG GGTATAACA CTAGTATATT	2195
TAAACTTACA GGCTTATTTG TAATGTAAAC CACCATTTTA ATGTACTGTA ATTAACATGG	2255
TTATAATACG TACAATCCTT CCCTCATCCC ATCACAAC TTTTTTTGTG TGTGATAAAC	2315
TGATTTTGGT TTGCAATAAA ACCTTGAAAA ATAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	2370

Fig. 2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Thr Val Lys Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg
 1 5 10 15
 Met Arg Gly Met Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg
 20 25 30
 Met Gly Leu Asn Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala
 35 40 45
 Cys Lys His Pro Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln
 50 55 60
 Glu Pro Glu Leu Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser
 65 70 75 80
 Gln Gln Ile Asn Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser
 85 90 95
 Asp Phe His Phe Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val
 100 105 110
 Leu Leu Ala Arg His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val
 115 120 125
 Leu Gln Lys Lys Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met
 130 135 140
 Ser Glu Arg Asn Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Gly Leu His Phe Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu
 165 170 175
 Asp Tyr Ile Asn Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg
 180 185 190
 Cys Phe Leu Glu Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser
 195 200 205
 Ala Leu Gly Tyr Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys
 210 215 220
 Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp
 225 230 235 240
 Phe Gly Leu Cys Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr
 245 250 255
 Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln
 260 265 270
 Pro Tyr Asp Arg Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr
 275 280 285

EP 0 861 896 A2

Glu Met Leu Tyr Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu
290 295 300

Met Tyr Asp Asn Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile
305 310 315 320

Thr Asn Ser Ala Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg
325 330 335

Thr Lys Arg Leu Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His
340 345 350

Val Phe Phe Ser Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile
355 360 365

Thr Pro Pro Phe Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Glu Leu Arg His
370 375 380

Phe Asp Pro Glu Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys
385 390 395 400

Ser Pro Asp Ser Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu
405 410 415

Ala Phe Leu Gly Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu
420 425 430